



Kapillaarielektroforeesin hyödyntäminen ympäristöanalytiikassa

Akseli Kumpula
Kandidaatintutkielma
Kemian tutkinto-ohjelma
Oulun yliopisto
2021

TIIVISTELMÄ

Kapillaarielektroforeesi on osoittautunut mielenkiintoiseksi vaihtoehdoksi perinteisten ionikromatografisten erotusmenetelmien rinnalle. Tässä kirjallisuustutkielmassa tutustutaan epäorgaanisten yhdisteiden elektroforeettiseen erottamiseen erilaisista ympäristömatriiseista, sekä selvitetään kuinka analyysimenetelmää voidaan hyödyntää ympäristöanalytiikan näkökulmasta erilaisissa käytännön sovellutuksissa.

Tarkasteltavien ionispesiesten erottumiseen vaikuttaa lukuisia tekijöitä käytettävästä kapillaarista, elektrolyyttiliuoksesta sekä näytteensyöttötekniikasta aina näytteenkäsittelyyn ja detektointimenetelmän valintaan saakka. Tutkielmassa esille tuodut teoreettiset seikat ja konkreettiset käytännön esimerkit pohjautuivat kirjallisuusjulkaisuihin, joiden avulla tuotiin esille teorian kannalta tärkeimpiä asioita ja korostettiin menetelmän asemaa ja soveltuvuutta käytännön ympäristönäytteiden analyysissä.

Kapillaarielektroforeesin voidaan todeta soveltuvan luotettavasti ja monipuolisesti lukuisten ympäristömatriisien sisältämien epäpuhtauksien määrittämiseen. Laadukkaalla laitteistolla, riittävällä taustatutkimuksella ja erotusolosuhteiden optimoinnilla tulosten toistettavuus, tarkkuus ja oikeellisuus voidaan saada luotettavalle tasolle.

SISÄLLYSLUETTELO

TIIVISTELMÄ

1. JOHDANTO	1
2. KAPILLAARIELEKTROFOREESIN TEORIA	2
2.1. Erottumisen toimintaperiaate	2
2.2. Kapillaarielektroforeesilaitteisto	3
2.3. Erotusolosuhteiden vaikutus	6
2.4. Kapillaarin huolto ja näytteiden esikäsittely	8
2.4.1. Näytteiden on-line esikonsentroitimenetelmät.....	8
3. KAPILLAARIELEKTROFOREESIN HYÖDYNTÄMINEN YMPÄRISTÖANALYTIKASSA	11
3.1. Kapillaarielektroforeesin asema ympäristönäytteiden analysoimisessa.....	11
3.2. Kapillaarielektroforeesimenetelmän käyttökohteet	12
4. KAPILLAARIELEKTROFOREESIN KÄYTÄNNÖN SOVELLUTUKSET	15
4.1. Metalli- ja ammoniumkationien erottaminen vesinäytteistä	15
4.2. Epäorgaanisten typpispesiesteren erottaminen jätevedestä	18
5. YHTEENVETO	21
6. KIRJALLISUUSVIITTEET	22

1. JOHDANTO

Kapillaarielektroforeesi (*capillary electrophoresis*, CE) on suhteellisen uusi ja tehokas analyttinen erotusmenetelmä, joka perustuu ionien liikkumiseen, kun varautuneet molekyylit tai ionit kulkeutuvat fluidin mukana ulkoisen sähkövirran vaikutuksesta.¹ Menetelmä on osoittautunut kiinnostavaksi ja luotettavaksi vaihtoehdoksi rutiininomaisissa analyyseissä. Erityisesti epäorgaanisten kationien ja anionien määrittäminen kapillaarielektroforeesitekniikalla ovat saaneet osakseen paljon huomiota.¹⁻¹¹

Kapillaarielektroforeesi on hyvin samankaltainen erotusmenetelmä kuin laajasti käytetyt ionikromatografiset (IC) tekniikat. CE-tekniikan etuina ovat muun muassa sen yksinkertainen toimintaperiaate, nopeus, korkea erotustehokkuus, sekä alhaiset käyttökustannukset.¹² CE- ja IC-tekniikoita voi olla syytä pitää vielä rinnakkaisina, toisiaan tukevin analyysimenetelminä, koska kapillaarielektroforeesin sisältämät haasteet eivät välttämättä mahdollista sen käytettävyyttä analyysilaboratorioiden ensisijaisena analyysimenetelmänä. Haasteita ilmenee näytteenkäsittelyn ja uudelleentoistettavuuden suhteen, mutta kun ne saadaan ratkaistua, tarjoaa menetelmä erinomaisen vaihtoehdon erilaisten ympäristönäytteiden sisältämien epäpuhtauksien pitoisuuksien määrittämiseen. Erilaisten detektorien, paremman toimintaperiaatteen ymmärtämisen sekä automatisoitujen laitteistokomponenttien avulla erotustekniikan tarkkuutta ja toistettavuutta voidaan parantaa merkittävästi. Kapillaarielektroforeesin käytännön sovellutusten määrä on kasvussa, joka osoittaa sen saavuttavan vakaampaa asemaa analyysimenetelmänä. Useammat tässä tutkielmassakin esille tuodut käytännön sovellukset tarjoavat mahdollisuuksia ja ideoita uusien käyttökohteiden löytämiseksi.

Tässä kandidaatintutkielmassa selvitetään, millaisia asioita tulee ottaa huomioon suunniteltaessa CE-tekniikalla suoritettavia analyysejä, ja kuinka menetelmää voidaan hyödyntää käytännön sovelluksissa erilaisten ympäristönäytteiden sisältämien epäorgaanisten yhdisteiden kvantitatiivisissa ja kvalitatiivisissa määrittelyissä. Koska kyseessä on suhteellisen uusi, ja täten varmasti monelle lukijalle vieras erotusmenetelmä, myös CE-tekniikan toimintaperiaatteeseen ja erottumiseen vaikuttaviin asioihin perehdytään tutkielman teoriaosuudessa melko laajasti.

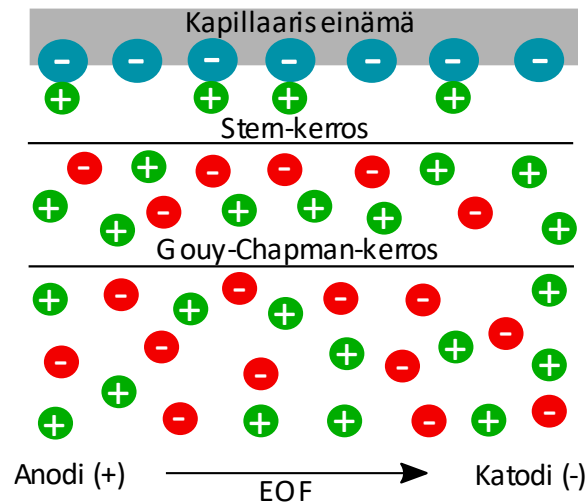
2. KAPILLAARIELEKTROFOREESIN TEORIA

Suurin osa teoriaosuuden varsinaisesta sisällöstä perustuu kirjaan *Analysis and Detection by Capillary Electrophoresis*², sillä se tarjoaa erinomaisella kattavuudella tietoa kapillaarielektroforeesitekniikasta.

2.1. Erottumisen toimintaperiaate

Elektroforeettisen erottumisen ajavia voimia ovat elektroforeettinen liikkuvuus sekä elektroosmoottinen virtaus (*electroosmotic flow*, EOF). Ionispesieksen elektroforeettinen liikkuvuus on riippuvainen sen koosta ja varauksesta, mutta myös luonteesta, elektrolyytin pitoisuudesta sekä lämpötilasta. Ionin nopeus sähkökentässä lisääntyy, kun varaus/koko - suhde kasvaa, joten pienikokoiset, suuren varauksen omaavat ionit etenevät suuremmalla nopeudella. Neutraalit spesiekit eivät erotu elektroforeettisen liikkuvuuden vaikutuksesta.²

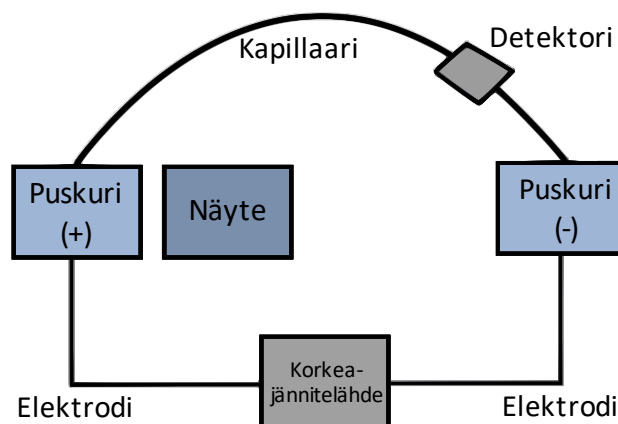
Elektro-osmoottinen virtaus tarkoittaa nestevirtausta, joka aiheutuu sähkökentän vaikutuksesta, kun ioniliuos on kosketuksissa varauksellisen kiinteän pinnan kanssa. Esimerkiksi silikaliuoksen rajapinnalla elektrolyyttiliuoksen kanssa, jolloin kapillaariseinämällä on negatiivinen varaus johtuen pinnalla tapahtuvasta silanoliryhmien ionisaatiosta. Osa näiden anionien vastaioneista on sijoittunut kapillaariseinämän ja liuoksen väliseen rajapintaan. Seurauksena on niin sanottu sähköinen kaksoiskerros (*electric double layer*), joka muodostuu kuvan 1 mukaisesti kapillaariseinämän vieressä olevasta sisemmästä pysähtyneestä kerroksesta (Stern-kerros) ja ulommasta liikkuvasta diffuusiokerroksesta (Gouy-Chapman -kerros). Diffuusiokerroksen kationit kulkeutuvat kohti katodia, ja koska nämä ionit ovat solvatoituneita, ne vetävät liuotinta mukanaan kohti katodia muodostaen elektro-osmoottisen virtauksen.² Elektro-osmoottinen virtaus saa kaikki näyteliuoksen komponentit, myös neutraalit spesiekit, etenemään samaan suuntaan.⁴ Elektroosmoottisen virtauksen toimintaan voidaan vaikuttaa merkittävästi useilla eri tekijöillä, sillä se on riippuvainen muun muassa sähkökentän voimakkuudesta ja elektrolyyttiliuoksen pH-arvosta, koska se vaikuttaa silanoliryhmien ionisoitumiseen ja täten kapillaariseinämän kokonaisvaraukseen.



Kuva 1. Kapillaarissa tapahtuvan sähköisen kaksoiskerroksen (pysähtynyt Stern- ja liikkuva Gouy-Chapman -kerros) ja elektro-osmoottisen virtauksen (EOF) muodostuminen. Mukaillen lähteestä [13]. Alkuperäisen kuvan lisenssi: CC BY-NC-SA 4.0.

2.2. Kapillaarielektroforeesilaitteisto

Kapillaarielektroforeesissa käytettävä laitteisto on kokonaisuudessaan hyvin yksinkertainen ja helppo rakentaa. Yksinkertaisimmillaan instrumentaatio voidaan toteuttaa kuvan 2 mukaisesti siten, että elektrolyyttiliuoksella täytetty kapillaari kytketään kahteen samalla elektrolyyttiliuoksella täytettyyn astiaan, joihin asetetaan myös elektrodit. Näyteliuos injektoidaan kapillaariin ja elektrodien välille kytketään jännite. Kapillaarin toiseen päähän kytketään valittu detektointilaitteisto, josta saatavat signaalit analysoidaan.



Kuva 2. Kapillaarielektroforeesilaitteiston peruskomponentit. Mukaillen lähteestä [4].

Kapillaari valmistetaan yleisimmin kvartsilasista, sillä sen valmistaminen on helppoa ja edullista. Lisäksi kvartsilasi on erinomainen materiaali sen UV/VIS-säteilyn läpäisyvyyden vuoksi, jolloin kapillaarin sisäinen optinen detektointi on mahdollista. Kapillaari päällystetään usein polymeeripinnoitteella, mikä lisää niiden joustavuutta ja helpottaa käsittelyä. Kapillaarien sisähalkaisijat vaihtelevat 2 - 200 μm välillä, joskin yleisimmin käytetyt kapillaarit ovat sisähalkaisijaltaan 25 - 75 μm . Pituudeltaan kapillaarit ovat yleisesti 50 - 100 cm mittaisia.² Käytetystä CE-tekniikasta riippuen, kapillaarit voidaan täyttää vain elektrolyyttiliuoksella, tai ne voivat sisältää lisäksi geeliä tai jonkin muun kiinteän faasin. Joka tapauksessa on hyvin merkityksellistä, millainen kapillaarin sisäseinämä on kemialliselta luonteeltaan ja miten se käyttäytyy näyteliuoksen tai elektrolyyttiliuoksen komponenttien kanssa. Tämän vuoksi kapillaarin sisäseinämä päällystetään usein käyttämällä esimerkiksi polyakryyliamidia tai polyetyleeniglykolia, joilla molemmilla on elektro-osmoottista virtausta pienentävä vaikutus, ja toisaalta ne estävät komponenttien adsorption kapillaariin.^{2,4}

Näytteensyöttöön käytetään yleisimmin elektrokineettistä tai hydrodynaamista injektiota, koska ne ovat yksinkertaisia tekniikoita toteuttaa. Elektrokineettisessä injektiossa näyte siirtyy näyteastiasta kapillaariin, kun sähkökenttä kytketään päälle muutamien sekuntien ajaksi käyttäen 3-5 kertaa alhaisempaa jännitettä verrattuna varsinaiseen erotusjännitteeseen.^{2,14} Ongelmana tässä tekniikassa on kuitenkin ionien erilaiset elektroforeettiset liikkuvuudet, jonka seurauksena suurempi ainemäärä nopeammin liikkuvia spesieksiä siirtyy kapillaariin. Injektiosta aiheutuvaa systemaattista virhettä voidaan vähentää, mikäli i) näyteliuoksen elektro-osmoottinen virtausnopeus on lähes sama kuin elektrolyyttiliuoksen ja ii) näytteensyötön elektro-osmoottinen virtausnopeus on lähes sama kuin erotuksessa. Nämä ehdot täyttyvät, kun varsinaisen näyteliuoksen pitoisuus on alhainen verrattuna elektrolyyttiliuoksen pitoisuuteen, ja kun injektiossa käytettävä jännite on lähes yhtä suuri kuin varsinaisessa erotuksessa käytettävä jännite.^{2,15}

Hydrodynaamisessa injektiossa kapillaari asetetaan näyteastiaan, jota nostetaan tietylle korkeudelle, jolloin muodostuu korkeusero nesteiden välille aiheuttaen hydrostaattisen paineen ja näytteen siirtymisen kapillaariin. Tekniikan etuna on, että liuenneiden aineiden elektroforeettisilla liikkuvuuksilla tai näyteliuoksen koostumuksella ei

ole vaikutusta injektioon, toisin kuin elektrokineettisessä injektiossa. Näyte voidaan injektoida myös paineistamalla näyteastia tai käyttämällä alipainetta.^{2,14}

Toisistaan hieman eroavia CE-tekniikoita on olemassa lukuisia. Tunnetuimmat CE-tekniikat ja niiden tärkeimmät ominaisuudet on listattu taulukossa 1. Tavallisin ja yksinkertaisin tekniikka on kapillaarivyöhyke-elektroforeesi (*capillary zone electrophoresis*, CZE), johon kapillaarielektroforeesista puhuttaessa yleensä viitataan ja jonka teoriaan tutkielman teoriaosuudessa suurimmaksi osin perehdytään.

Taulukko 1. Yleisimmät CE-tekniikat ja niiden ominaisuuksia.^{1,2,4}

Erotustekniikka	Tärkeimmät ominaisuudet
<i>Capillary zone electrophoresis</i> , CZE	CE:n yksinkertaisin muoto, jossa kapillaari täytetään puskuriliuoksella. Liuenneet yhdisteet erottuvat erillisinä vyöhykkeinä eroavilla nopeuksilla. Ajavina voimina elektroforeettinen liikkuvuus ja elektro-osmoottinen virtaus (EOF).
<i>Capillary gel electrophoresis</i> , CGE	Liuenneet yhdisteet seulotaan koon perusteella niiden kulkiessa polymeeristä valmistetun geelimäisen molekyyliseulan lävitse. Käytetään erotettaessa makromolekyylejä, joiden massa/varaus-suhteet eivät vaihtelee koon mukaan (esimerkiksi DNA ja tietyt proteiinit).
<i>Capillary electrochromatography</i> , CEC	Kapillaarielektroforeesin ja korkean erotuskyvyn nestekromatografian hybridimuoto, jossa liikkuva faasi kulkee kolonnin läpi paineen sijasta elektro-osmoosin avulla.
<i>Capillary isoelectric focusing</i> , CIEF	Amfolyyttien avulla muodostetaan pH-gradientteja. Spesiektet erottuvat väliaineessa kunnes ne saavuttavat alueen jossa niiden varaus kumoutuu (isoelektrinen piste). Fokusoinnin jälkeen spesiektet mobilisoidaan ja vyöhykkeet kulkeutuvat detektorille.
<i>Capillary isotachopheresis</i> , CITP	Kaksi erillistä puskuria, joiden väliin erottuvat vyöhykkeet liikkuvat samalla nopeudella, sillä jokaiseen vyöhykkeeseen kohdistuu erilainen sähkökenttä. Yhdellä kerralla voidaan analysoida joko kationeja tai anioneja.
<i>Micellar electrokinetic chromatography</i> , MEKC	Pinta-aktiivisilla aineilla muodostetaan misellejä, jotka vuorovaikuttavat eri tavalla kuin muut liuenneet yhdisteet (myös neutraalit spesiektet). Kun neutraali spesies ei ole kosketuksissa misellin kanssa, EOF ajaa spesiestä eteenpäin. Misellit käyttäytyvät kromatografisella tavalla hydrofobisen ja ionisen vuorovaikutuksen myötä.

Detektointiin voidaan käyttää lukuisia eri vaihtoehtoja, joista yleisimpiä ovat optiset detektorit ja erityisesti UV/VIS-absorptio, sillä kapillaari itsessään toimii kyvetinä, josta yhdisteiden pitoisuuksia voidaan suoraan määrittää. Nykyisin suositaan fotodiodikennoa (*photo diode array*, PDA), koska se käy läpi koko aallonpituusvälin samanaikaisesti ja sillä saadaan tarkempia piikkejä ja rakenneinformaatiota. Muita mahdollisia detektointimenetelmiä ovat termo-optinen ja elektrokemiallinen detektointi, johtokykydetektori, fluoresenssi, fosforesenssi, kemiluminesenssi, massaspektrometria ja ydinmagneettinen resonanssi eli NMR.² Viime vuosina detektoinnin osalta on saavutettu merkittäviä parannuksia, sillä erityisesti epäsuoraa fotometristä detektointia on kehitetty toimivammaksi siirtymällä käyttämään väriaineita indikaattorien tavoin sekä LED-valonlähteitä, jotka tarjoavat hyvin stabiilin ja lähes monokromaattisen säteilyn näkyvän valon aallonpituudella ja uusimmat jopa lähes UV-alueella. Suurin osa runsaasti absorboivien väriaineiden maksimiabsorptiosta on näkyvän valon alueella, joten perinteiset valonlähteet (deuterium-, sinkki- ja kadmiumlamput) eivät sovellu niiden alhaisen intensiteetin ja korkean kohinan vuoksi. Lisäksi on tapahtunut hyvin nopeaa kehitystä johtokykyyn perustuvan C⁴D-detektoinnin osalta. Kyseessä on kaupallisesti saatavilla oleva, ja ennen kaikkea herkkä detektori, joka soveltuu mahdollisesti kaikkien epäorgaanisten kationien ja anionien edulliseen määrittämiseen, ja joka mahdollistaa rutiininomaisten mittausten toteuttamisen myös kannettavalla instrumentoinnilla.¹⁶

2.3. Erotusolosuhteiden vaikutus

Analyyttien erottumiseen vaikuttavia tekijöitä on runsaasti ja niitä voitaisiin tarkastella paljon laajemmin ja yksityiskohtaisemmin, mutta tämän tutkielman tarkoituksena ei ole perehtyä teorian yksityiskohtiin, joten seuraavassa esitellään vain tärkeimpiä yleisiä asioita, joiden kontrolloinnilla ja muutoksilla on merkittävä vaikutus erottumisen onnistumiseen ja jotka täytyy ottaa huomioon CE-analyysiä suoritettaessa.

Merkittävä tekijä analyyttien erottumisen kannalta on käytettävän elektrolyyttiliuoksen koostumus ja erityisesti sen pH-arvo, sillä se vaikuttaa kapillaariseinämiin kiinnittyneiden silanoliryhmien ionisoitumiseen ja elektrolyyttiliuoksen sekä analyyttien välisiin vuorovaikutuksiin. Yleisesti käytetään puskuriliuoksia, joilla pH-arvo

saadaan vakioitua analyysin ajaksi. On kuitenkin tärkeää, että puskuriliuoksella ei ole negatiivista vaikutusta elektroforeettiseen erottumiseen, ja että liuenneet yhdisteet pysyy edelleen liukoisina ja stabiileina.² Sopivan puskuriliuoksen ja sen ominaisuuksien säätäminen on vaativa osuus ja edellyttää laajaa kokeellista testausta ennen kuin analyysitulokset saadaan riittävän luotettavalle tasolle.

Kapillaarin ominaisuuksilla on merkittävä vaikutus erottumiseen; valmisteluun ja käsittelyyn käytetyt materiaalit määrittävät sisäseinämän luonteen, jolla on suuri vaikutus siihen kuinka elektrolyyttiliuoksen komponentit tai varsinaiset analyytit adsorption vaikutuksesta vuorovaikuttavat kapillaarseinämän kanssa.² Myös lämpötilalla on vaikutusta analyyttien erottumiseen, sillä viskositeetti ja sen myötä ionispesiesten liikkuvuus ovat riippuvaisia lämpötilasta. CE-instrumenteissa usein suositaankin termостоituja eli lämmönsäätelyllä varustettuja kapillaareja, koska siten lämmönsiirto tapahtuu optimaalisesti ja näin poistetaan mahdollisuus viskositeettigradienttien muodostumiseen puskurissa, jotka aiheuttavat poikkeamia nopeusprofiileihin ja sitä kautta piikkien levenemistä ja korkeampia välipohjia.^{1,14}

Käytetyllä näytteensyöttötekniikalla on hyvin merkittävä vaikutus erottumisen onnistumisen ja tulosten kannalta. Pienet näytemäärät (joitain nanolitroja) aiheuttavat haasteita analyysin uudelleentoistettavuudelle, jota voidaan parantaa käyttämällä automaattisia näytteensyöttöyksiköitä. Myös detektointimenetelmä on valittava huolellisesti, jotta tutkittavan näytteen sisältämien epäpuhtauksien pitoisuudet saadaan määritettyä riittävällä herkkyydellä ja tarkkuudella.

Erotusolosuhteiden testaamiseen ja CE-systeemin optimointiin on kehitetty myös erilaisia ohjelmistoja, joista eräs täysin vapaasti saatavilla oleva simulointiohjelmisto on *Peakmaster*, jonka on kehittänyt Kaarlen yliopiston professori Bohuslav Gaš yhdessä tutkimusryhmänsä kanssa vuonna 2005. Ohjelmisto mahdollistaa CE-laitteiston parametrien säätämisen ja optimoinnin riittävän määrittäysherkkyyden ja resoluution saavuttamiseksi.¹⁷

2.4. Kapillaarin huolto ja näytteiden esikäsittely

Hyvän toistettavuuden saavuttamiseksi on välttämätöntä huoltaa kapillaari säännöllisesti; kapillaariseinämän ominaisuuksien ylläpitäminen samanlaisena määritysten välillä on yksi CE-tekniikan haasteista. Tavallinen kapillaarin peruskäsittely koostuu sen seinämän palauttamisesta takaisin alkutilanteeseen deprotonoimalla silanoliryhmät, eli poistamalla protoni silanoliryhmästä muodostaen jälleen negatiivisesti varautunut seinämä. Tämä tyypillisesti suoritetaan pesemällä kapillaarin sisäpinta NaOH-liuoksella, jonka jälkeen kapillaari kunnostetaan elektrolyyttiliuoksella. Tarvittaessa voidaan käyttää myös vahvaa happoa, orgaanista liuotinta tai pesuainetta kapillaarin puhdistamiseksi ennen analyysiä.⁴ Erityisesti kapillaari täytyy puhdistaa – tai jopa vaihtaa – kun se on pidemmän aikaa käyttämättä ettei kapillaari tukkeudu, kun elektrolyyttiliuos ja muut mahdolliset liuosten jätteet kuivavat seinämiin kiinni.¹

Näytematriisista riippuen ympäristönäytteiden tutkiminen edellyttää yleensä näytteen esikäsittelyä, jotta tutkittava näyte saadaan muokattua kapillaariin syötettävään muotoon; esimerkiksi kiinteä maaperänäyte tulee liuottaa. Eräät ionispesieket edellyttävät myös kemiallista käsittelyä, jotta niiden erottuminen mahdollistuu. Näytteiden esikäsittely voi olla esimerkiksi suodatusta^{6,8,10}, tiettyjen ionikomponenttien kompleksointia^{7,8}, vesiuuttoa^{9,10}, sonikaatiota⁹ tai joissain tapauksissa myös laimennusta.¹⁰ Myös hyvin viskoosin näytteen, kuten hunajan syöttö kapillaariin sellaisenaan on osoitettu mahdolliseksi.¹¹

2.4.1. Näytteiden on-line esikonsentroitimenetelmät

Ympäristönäytteiden sisältämien spesiesten alhaiset pitoisuudet jäävät usein sellaisenaan CE-analyyseissä yleisimpien fotometristen detektorien toteamisrajojen alapuolelle. Näyteliuosten pitoisuutta tulee kasvattaa, jotta yksinkertaista kapillaarin sisäistä detektointia olisi mahdollista hyödyntää. Alhaista CE-tekniikan herkkyyttä voidaan parantaa näyteliuosten esikonsentroinnilla, tai vaihtoehtoisesti analyysin aikana ns. on-line eli kapillaarin sisäisellä konsentroinnilla, jonka taustalla on lähtökohtaisesti aina kyse analyyttien nopeuden muutoksesta näyte- ja elektrolyyttiliuosvyöhykkeen välillä. Tarkastellaan lyhyesti viittä erilaista on-line esikonsentroitintekniikkaa, joita ovat kenttävahvistettu näytteen konsentointi (*field-amplified sample stacking*, FASS), suuritulavuuksinen näytteen

konsentrointi (*large volume sample stacking, LVSS*), dynaaminen pH-vyöhykekonsentrointi (*dynamic pH junction*), isotakoforeettinen konsentrointi sekä pyyhkäisytekniikka (*sweeping*). Vaikka jokainen edellä mainituista konsentroimistekniikoista on sellaisenaan hyödyllinen ja joissain tapauksissa välttämätöntä, on niiden yhdistäminen hyvin kiinnostava vaihtoehto, jonka myötä voidaan saavuttaa vielä tehokkaampaa parannusta detektointiherkkyydessä.¹⁸

Näistä tekniikoista yksinkertaisin on FASS eli kenttävahvistettu näytteen konsentrointi, joka vaatii johtokyvyltään näyteliuosta suuremman elektrolyyttiliuoksen käyttämistä. Kapillaarissa paikallinen sähkökenttä on kääntäen verrannollinen johtavuuteen, joten hydrodynaamisesti syötettyyn näytevyöhykkeeseen muodostuu voimakas sähkökenttä, jonka seurauksena tällä alhaisen johtavuuden vyöhykkeellä analyyteillä on suuri nopeus. Täten analyyttien siirtyessä elektrolyyttiliuoksen alhaisempaan sähkökenttään, niiden nopeus laskee ja tapahtuu konsentroitumista kapeiksi alueiksi. FASS mahdollistaa pitoisuuksien 10-kertaistamisen.¹⁸

Suuremman pitoisuusvaikutuksen saavuttamiseksi voidaan hyödyntää LVSS-tekniikkaa eli suuritilavuuksista näytteen konsentrointia, joka mahdollistaa yli 100-kertaisen pitoisuuden kasvattamisen. Tässä tekniikassa näytematriisi poistetaan kapillaarista ennen CE-erottumista, mikä voidaan suorittaa joko polaarisuuden kääntämisellä tai ilman sitä. Ensimmäisessä tapauksessa matriisin poisto ja anionien esikonsentrointi saavutetaan negatiivisella jännitteellä voimakkaan positiivisen elektro-osmoottisen virtauksen (EOF) vaikutuksesta, minkä jälkeen polaarisuus vaihdetaan positiiviseksi. Kationien tapauksessa käytetään apuaineita EOF:n suunnan kääntämiseksi. Onnistuneen konsentroidinnin edellytyksenä on, että analyyttien elektroforeettinen liikkuvuus näyteliuoksessa on suurempi ja vastakkaissuuntainen kuin EOF. Mikäli polarisuutta ei käännetä, konsentrointi suoritetaan happamissa olosuhteissa alhaisen EOF:n alaisena, jonka suunta on vastakkainen elektroforeettisen erottumisen suunnan kanssa. Tekniikan heikkoutena on sen kyky konsentroida ja erottaa määrityksen aikana vain joko anioneja tai kationeja.¹⁸

Dynaamisen pH-vyöhykekonsentroidinnin periaatteena on muodostaa kahden eri pH-arvon omaavan puskurin välille yhdyskohta, jolloin esikonsentrointi saavutetaan elektrolyyttiliuoksissa tapahtuvien analyyttien erilaisten dissosiaatioiden avulla. Tekniikka

hyödyntää merkittävästi muuttuvia analyyttien ionisaatiotiloja tai elektroforeettisia liikkuvuuksia poikkeavien pH-arvojen välillä. Esimerkiksi happamaan matriisiin liuennut heikosti hapan analyytti syötetään pitkänä tulppavirtauksena emäksisellä elektrolyyttiliuoksella täytettyyn kapillaariin, jolloin positiivinen jännite näytteensyöttöpäässä aiheuttaa happaman näytevyöhykkeen vaiheittaisen titrautumisen hydroksidi-ioneilla ja analyytti ionisoituu neutraalivyöhykkeelle. Anioniset analyytit kulkeutuvat kohti anodia kunnes ne saavuttavat happaman näytevyöhykkeen, jossa ne protonoituvat jälleen neutraaleiksi ja pysähtyvät.¹⁸

Isotakoforeettinen konsentrinti viittaa taulukossa 1 esitettyyn CIP-tekniikkaan (*capillary isotachopheresis*), jossa näytevyöhyke kerrostetaan johtavan ja päättävän elektrolyyttiliuoksen väliin, jotka sisältävät rinnakkaisia ioneja vastaavasti nopeammilla ja hitaammilla elektroforeettisilla liikkuvuuksilla. Jännitteen kytkeminen muodostaa potentiaaligradientin ja vakiovirran kaikkien kolmen vyöhykkeen kohdalle. Jokaisessa vyöhykkeessä sähkökentän voimakkuus on kääntäen verrannollinen sen sisältämien ionien liikkuvuuteen, joten jokaisen kolmen vyöhykkeen ionit etenevät samalla nopeudella. Vakiotilan saavutettuaan analyytit asettuvat erillisiin kaistoihin liikkuvuuksien perusteella. Johtavan ja päättävän puskurin pitoisuudet määrittävät kokonaisvirran ja analyyttien lopullisen konsentraation kussakin kaistassa.¹⁸

Pyyhkäisytekniikka on konsentrintimenetelmä, jossa varaukselliset apuaineet, esimerkiksi pinta-aktiiviset aineet, vuorovaikuttavat näyteliuoksen komponenttien kanssa aiheuttaen niiden fokusoitumisen kapillaarin sisällä. Pyyhkäisy perustuu analyyttien jakautumiseen ei-misellisen elektrolyyttiliuoksen ja pseudostationaarisen misellifaasin välillä. Näyteliuoksen analyytit pyyhkäistään ja erotetaan MEKC-tekniikalla (*micellar electrokinetic chromatography*).¹⁸ Pyyhkäisytekniikan osalta on osoitettu jopa tuhatkertaisia parannuksia detektointiherkkyyteen, mikä alentaa todella merkittävästi menetelmän toteamisrajoja.¹⁹

3. KAPILLAARIELEKTROFOREESIN HYÖDYNTÄMINEN YMPÄRISTÖANALYTIKASSA

3.1. Kapillaarielektroforeesin asema ympäristönäytteiden analysoimisessa

Terveyden kannalta turvallisen elinympäristön ja -olosuhteiden takaaminen ja varmistaminen edellyttävät pitkälle kehitettyjä ja tarkkoja seurantamenetelmiä, joilla voidaan määrittää epäpuhtauksien alhaisia pitoisuuksia laajalla skaalalla eri ympäristönäytteistä. Mahdollisesti vaarallisten yhdisteiden, kuten esimerkiksi epäorgaanisten saasteiden, kontrollointi ja seuranta on ensiarvoisen tärkeää, jotta asetetut turvallisuustavoitteet täytetään.³

CE-tekniikan yleisiä etuja verrattuna IC-tekniikoihin ovat sen edullisemmat investointi- ja käyttökustannukset, korkea erotustehokkuus, hyvä tarkkuus, yksinkertaisempi ja automatisoitava instrumentaatio, sekä selvästi pienempi tarve esimerkiksi orgaanisten liuottimien käytölle. Näytteiden esikäsittelylle ei usein ole tarvetta tai se on vähäistä. Analyysin kesto on CE-tekniikassa merkittävästi lyhyempi, ja pienien näytetilavuuksien (muutamia kymmeniä mikrolitroja) ansiosta menetelmä tarjoaa kiinnostavan vaihtoehdon analyytiikoille, jotka käsittelevät vaarallisia kemikaaleja sisältäviä näytteitä.^{3,12,20} Todellisuus ei kuitenkaan ole aivan näin mustavalkoinen, sillä ympäristönäytteiden sisältämien epäpuhtauksien pitoisuudet ovat joskus niin alhaisia, että detektoinnin herkkyyks muodostuu analyysin rajoittavaksi tekijäksi. Tällöin vaaditaan riittävää näytteiden esikäsittelyä, pitoisuuden kasvattamista on-line konsentroinnilla, tai on valittava detektointimenetelmä ja elektrolyyttiliuoksen komponentit sekä ominaisuudet uudestaan. Yhdistelmätekniikoiden avulla, kuten esimerkiksi kytkemällä erittäin herkkä massaspektrometri CE-laitteistoon, useimmat ongelmatilanteet on saatu ratkaistua.³

Tuntemattomien näytteiden analysoiminen voi olla haasteellista, sillä useat epäorgaaniset spesiekit voivat jäädä havaitsematta, koska vallitsevat CE-olosuhteet eivät mahdollista niiden erottumista. Tämä voi edellyttää samalle näytteelle useampia poikkeavia esikäsittelyvaiheita ja määrittäviä vaihtelevilla elektrolyyttiliuoksen koostumuksilla. Haasteena on muuttuvien parametrien määrä, sillä pelkästään elektrolyyttiliuoksen ominaisuuksia voidaan muuttaa lähes rajattomasti, joten optimiolosuhteiden löytäminen vie aikaa ja resursseja ennen kuin menetelmää voidaan hyödyntää rutiininomaisesti.

Huomattavasti tunnetummat ja yleisemmin käytetyt ionikromatografiset tekniikat ovat jo saavuttaneet edistyneen vaiheen hyvin kehitettyjen laitteistojen, suuren käyttäjäkunnan ja lukuisten käyttökohteiden tukemana. Valtaosa epäorgaanisten anionien ja kationien määrittämisestä on tähän asti toteutettu ionikromatografiaan perustuvilla erotusmenetelmillä. Vertailemalla IC- ja CE-tekniikoita voidaan kuitenkin todeta niiden olevan lähtökohtaisesti toisiaan tukevia, ei-kilpailevia analyysitekniikoita; toisen tekniikan heikkoudet ovat usein toisen vahvuuksia.^{3,12,20,21} Eikä ole merkityksellistä pohtia, milloin kapillaarielektroforeesi tulee syrjäyttämään ionikromatografiset tekniikat, koska on olemassa ilmiselvät mahdollisuudet molempien menetelmien olemassaololle ja rinnakkaiselle käytölle, jolloin tarjoutuu ratkaisu useimpiin käytännön ongelmiin määrittäessä ympäristönäytteiden sisältämiä epäorgaanisia yhdisteitä.¹²

Perusedellytys CE-analyysien onnistumiseen on ymmärrys lukuisten parametrien vaikutuksista erottumiseen. Huolellisten ja tarkkojen kokeiden myötä voidaan löytää sopivat näytteensyöttö- ja detektointimenetelmät, sekä säätää kapillaarin ja elektrolyyttiliuosten ominaisuudet sille tasolle, että saadaan tutkimuksen kannalta riittävän luotettavat ja tarkat tulokset. Kapillaarielektroforeesin merkitys ympäristöanalytiikassa on erittäin lupaava, ja se tarjoaakin hyvän vaihtoehtoisen menetelmän lukuisten epäorgaanisten analyyttien erottamiseen. Tulevaisuudessa on odotettavissa CE-laitteiston kuuluvan yhä useamman analyysilaboratorion perusvarusteluihin.

3.2. Kapillaarielektroforeesimenetelmän käyttökohteet

Kapillaarielektroforeesi soveltuu laajasti erilaisten ympäristömatriisien sisältämien epäorgaanisten yhdisteiden analysoimiseen määrittäessä muun muassa ilman sisältämien partikkelien, erilaisten aerosolien, sade-, hana- ja jätevesien, maaperän sekä kasvien sitomien epäpuhtauksien pitoisuuksia. Vaikka kapillaarielektroforeesi soveltuu käytettäväksi myös orgaanisten yhdisteiden erottamiseen, tässä yhteydessä tarkastellaan vain epäorgaanisten yhdisteiden määrittämistä. Mahdollisten sovelluskohteiden määrä on jatkuvassa kasvussa, mikä on ensiarvoisen merkityksellistä, jotta menetelmän käyttäjäkuntaa saadaan kasvatettua ja yhä useampi analyysilaboratorio ottaisi erotusmenetelmän rutiininomaiseen käyttöön.

Taulukkoon 2 on koottu esimerkkejä epäorgaanisten ionien määrittämisestä erilaisista näytematriiseista. Taulukossa esitetään minkälainen esikäsittely analysoitaville näytteille on tehty, mistä käytetty elektrolyyttiliuos on muodostettu ja mitkä ovat olleet erottumisen pH-arvo sekä spesiesten tunnistamiseen käytetty detektointimenetelmä. Lisäksi taulukosta voidaan nähdä joitain tapauskohtaisia kommentteja spesiesten toteamisrajoista, suhteellisesta keskihajonnasta tai tulosten vertailtavuudesta suhteessa rinnakkaiseen menetelmään. Koosteen tarkoituksena on osoittaa kapillaarielektroforeesin potentiaali sen monipuolisen soveltuvuuden puolesta, eli mistä kaikista erilaisista näytematriiseista ionispesieksiä voidaan menetelmällä määrittää. Näistä tapauksista perehdytään tarkemmin kahteen käytännön sovellukseen kappaleessa 4.

Taulukko 2. CE-tekniikalla suoritettuja epäorgaanisten ionien määrittämiä.

Analyytti	Näytematriisi	Esikäsittely	CE-olosuhteet ^a	Kommentit	Viite
NH ₄ ⁺ , K ⁺ , Li ⁺ , Na ⁺ , Rb ⁺ , Cs ⁺ , Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , Ba ²⁺ , Sr ²⁺	Sade-, hana- ja mineraali- vesi	---	5 mM bentsimidatsoli; 5 mM tartraatti; 40 mM 18-kruunu- 6-eetteri; 0,1% HEC; 0,1% m-HEC, pH 5,2; epäsuora UV (254 nm)	Piikkien pinta- alojen RSD* harvoin parempi kuin 7 - 10%	5
NH ₄ ⁺ , K ⁺ , Na ⁺ , Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , SO ₄ ²⁻ , NO ₃ ⁻ , NO ₂ ⁻ , Cl ⁻	Jätevesi	Suodatus	100 mM L-histidiini; 100 mM MES; 0,13 mM CTAB; 1,5 mM 18-kruunu-6-eetteri, pH 6; C ⁴ D-detektointi	Palautumisaste typpispesieksille 90 - 108%	6
Fe ²⁺ , Fe ³⁺	Hana- ja pohjavesi	Kompleksointi (CDTA ja 1,10- fenantrolini)	100 mM boraattipuskuri, pH 9,0; suora UV (254 nm)	Toteamisrajat Fe ²⁺ 0,06 mg l ⁻¹ Fe ³⁺ 0,1 mg l ⁻¹	7
Cl ⁻ , SO ₄ ²⁻ , NO ₃ ⁻	Maaperäliuos	Suodatus, 10 vol-% 20 mM EDTA lisäys (pH 11)	3 mM trimelliittihappo; 0,02 vol-% DETA, pH 5,8; epäsuora UV (254 nm)	Toteamisrajat 0,28-0,96 µM	8
Cs ⁺ , Rb ⁺ , NH ₄ ⁺ , K ⁺ , Ca ²⁺ , Na ⁺ , Mg ²⁺ , Mn ²⁺ , Sr ²⁺ , Cd ²⁺ , Ba ²⁺ , Li ⁺	Ilmakehän aerosoli	Vesiuutto, 30 minuutin sonikaatio	5 mM DHBP; 6 mM glysiini; 2 mM 18-kruunu-6-eetteri; 2% metanoli, pH 6,5; epäsuora UV (280 nm)	Toteamisrajat 9 - 57 µg l ⁻¹ ; tulokset yhtenevät IC- analyysin kanssa	9
NO ₂ ⁻ , NO ₃ ⁻ , Cl ⁻ , Br ⁻ , SO ₄ ²⁻ , HPO ₄ ²⁻	Kasvikset (15 erilaista)	Vesiuutto, suodatus, laimennus (nitraatti)	10 mM natriumkromaatti; 2,3 mM CTAB, pH 11,5; epäsuora UV (254 nm)	Tarkkuus vertailtavissa fotometriseen ref.menetelmään	10
K ⁺ , Na ⁺ , Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , Mn ²⁺ , Fe ³⁺ , Cu ²⁺ , Zn ²⁺ , Al ³⁺	Hunaja	---	0,3 M etikkahappo; 0,15 M maitohappo; 0,03 M imi- datsoli, pH 3,0; epäsuora UV (580 nm), referenssi 214 nm	Na ⁺ , Ca ²⁺ , Cu ²⁺ ja Mn ²⁺ vastaavat hyvin vrt. ICP-OES	11

^a HEC = hydroksietyyliiselluloosa; m-HEC = metyylihydroksietyyliiselluloosa; MES = 2-(N-morfoliini)etaanisulfoni-
happo; CTAB = setrimoniumbromidi; DETA = dietyleenitriamiini; DHBP = 1,1'-diheptyl-4,4'-bipyridinium
hydroxide; *RSD = suhteellinen keskihajonta (*relative standard deviation*).

4. KAPILLAARIELEKTROFOREESIN KÄYTÄNNÖN SOVELLUTUKSET

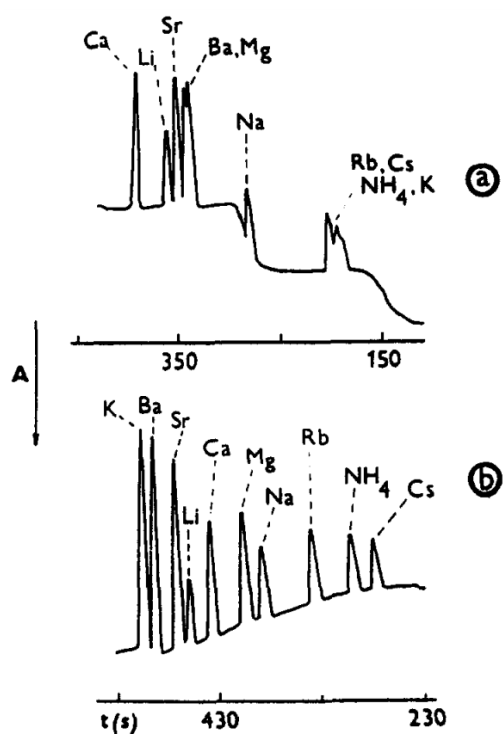
4.1. Metalli- ja ammoniumkationien erottaminen vesinäytteistä

Šimuničová tutkimusryhmineen⁵ perehtyi alkali- ja maa-alkalimetalli- sekä ammoniumkationien (NH_4^+ , K^+ , Li^+ , Na^+ , Rb^+ , Cs^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Ba^{2+} , Sr^{2+}) erottamiseen sade-, hana- sekä mineraalivesinäytteistä. Tutkimus suoritettiin CZE-tekniikalla (*capillary zone electrophoresis*) käyttäen detektoinnissa epäsuoraa UV-absorptiota. Tutkimuksessa selvitettiin kuinka sekä negatiivisesti varautuneiden vastaionien, että varauksettomien kruunueetterien kompleksoivilla vaikutuksilla voidaan vaikuttaa tarkasteltavien spesiesten erottumiseen. Tarkasteltavia näytteitä ei esikäsitelty mitenkään, vaan ne syötettiin sellaisenaan perfluorieteenipropeenista (FEP) valmistettuun kapillaariin (sisähalkaisija 300 μm , tehollinen pituus 250 mm) elektrokineettisellä injektioilla, ja erottumista tarkasteltiin UV-spektrofotometrisellä detektorilla (254 nm).⁵

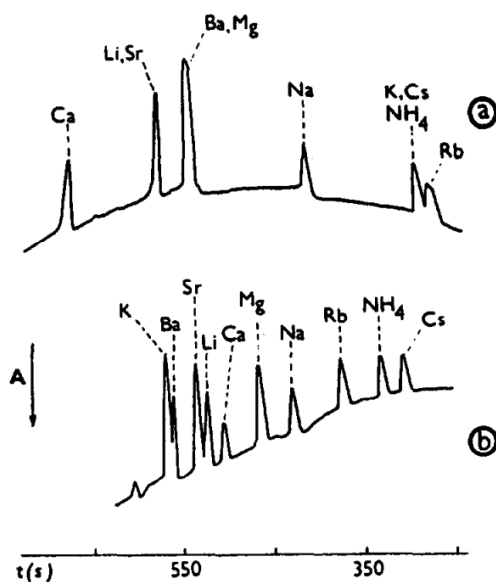
Kokeellisessa osuudessa vertailtiin useampia elektrolyyttikoostumuksia, joista sopivaksi (kompleksoivaksi) vastaioniksi havaittiin tartraatti, ja mahdollisiksi rinnakkaisioneiksi bentsimidatsoli tai 2,4,6-kollidiini, sillä muiden tapausten kohdalla havaittiin myös detektoinnin kannalta riittämätöntä erottelukykä ja poikkeamia elektroferogrammien perusviivassa tai suurempia häiriöitä signaaleissa. Käytännön näytteiden analysoimisessa valittiin rinnakkaisioniksi bentsimidatsoli. Rinnakkaisionilta vaaditaan vastaavanlaista liikkuvuutta kuin erotettavilta ioneilta, ja lisäksi alhaista konsentraatiota, mutta molaarisen absorboituvuuden täytyy olla suuri valitulla detektointiaallonpituudella; mahdollisuudet rajoittuivat merkittävästi, jotta nämä ehdot täytetään kaikkien spesiesten tapauksessa. Kapillaarin sisäisenä kompleksoivana apuaineena käytettiin 18-kruunu-6-eetteriä. Lämmönsiirron vähentämiseksi hyödynnettiin apuaineina hydroksietyyliselluloosaa ja metyylihydroksietyyliselluloosaa.⁵

Ba^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+} ja Mg^{2+} -ionit erottuvat vesipohjaisissa elektrolyyttisysteemeissä, ei-kompleksoivissa olosuhteissa tai heikosti kompleksoivien yhdisteiden kanssa, K^+ ja Na^+ -ionien väliin jäävillä liikkuvuuksilla. Tartraatilla saatiin aikaan muutos tähän erotuksen muotoon alentamalla näiden maa-alkalimetallikationien liikkuvuuksia suhteessa muihin analyytteihin (kuvat 3a ja 4a). Tämä ryhmän hidastuminen oli suotuisaa, sillä yhdistettynä

kruunueetterin kompleksoivaan vaikutukseen voitiin saavuttaa täydellinen analyyttien erottuminen (kuvat 3b ja 4b). Kuvan 3 elektroferogrammeista nähdään kationien erotusaikojen kasvaminen kruunueetterin lisäyksen myötä, mikä oli odotettua, sillä kruunukompleksoitujen kationien ioninen liikkuvuus on solvatoituneita kationeita alhaisempaa. Kuvasta 4 on kuitenkin nähtävissä Ca^{2+} , Sr^{2+} , Mg^{2+} ja Li^+ -ionien lyhyemmät erotusajat, jonka selittämiseksi ehdotettiin rinnakkaisionin eli kollidiinin kilpailevaa kompleksoitumista kruunueetterin kanssa.⁵ Kuvissa 3 ja 4 merkintä A varustettuna nuolella viittaa laskevaan absorptioon.



Kuva 3. Standardinäytteen elektroferogrammit ilman tartraattia sekä käyttäen elektrolyttisysteemien sekoitusta (a) ilman kruunueetteriä ja (b) kruunueetterin kanssa.⁵ Julkaistu Elsevierin luvalla.



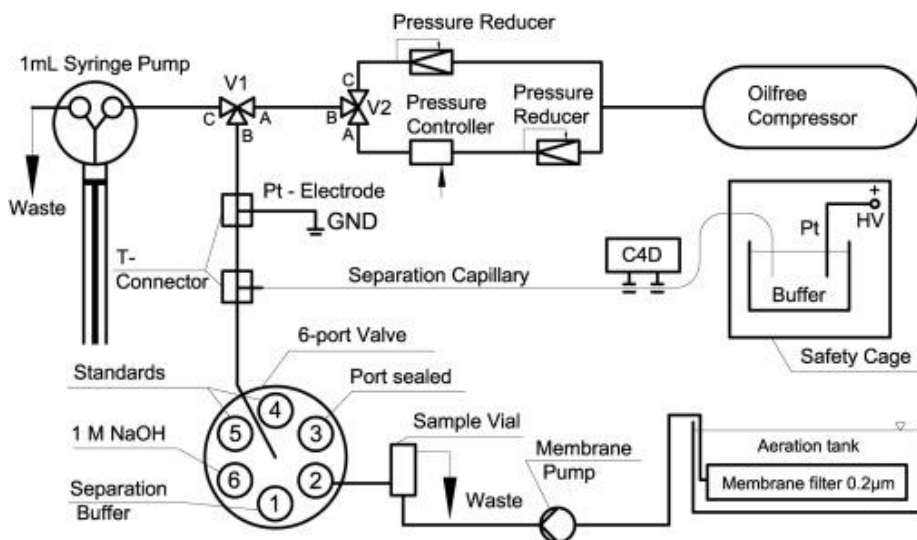
Kuva 4. Standardinäytteen elektroferogrammit käyttäen tartraattia sekä elektrolyttisysteemien sekoitusta (a) ilman kruunueetteriä ja (b) kruunueetterin kanssa.⁵
Julkaistu Elsevierin luvalla.

Lisäksi erotusjännitteiden vaikutusta tutkittiin vaihtelevilla jännitteillä (50, 75 ja 100 μ A). Alhaisemmalla jännitteellä erotusajat olivat luonnollisesti pidempiä, mutta elektroferogrammi sisälsi vähemmän poikkeamia ja resoluutio oli parempi. Standardinäytteiden ja kokeellisten näytteiden piikkien pinta-alojen suhteelliset keskihajonnat olivat vain harvoin parempia kuin 7-10% siitäkin huolimatta, että injektioaikoja kontrolloitiin tarkasti (noin 0,1%:n tarkkuudella) ja injektiovirta stabiloitiin 0,1%:n ennalta valitusta arvosta. Tutkimusryhmä katsoi vaihteluiden tärkeimmän syyn liittyvän näytteensyöttötekniikkaan, sillä erittäin kapeat kaistat erotettavista spesieksistä keskittyivät siihen kapillaarin päähän, joka siirretään liuoksesta toiseen.

Valituilla CE-olosuhteilla mahdollistettiin tutkittavien kationien täydellinen erottaminen yhdellä elektroforeettisella ajolla. Vaikka tarkasteltavista todellisista vesinäytteistä yksikään ei sisältänyt kaikkia tutkittuja kationeja havaittavilla pitoisuuksilla, lähestymistavan analyttinen potentiaali ja soveltuvuus on ilmeistä; yhdistämällä elektrolyttisysteemien komponenttien kompleksoivia vaikutuksia voidaan parantaa erottumisen selektiivisyyttä ja täten tarjota keinoja kehittää hyvin nopeita tapoja määrittää alkali- ja maa-alkalimetalli- sekä ammoniumkationien pitoisuuksia monenlaisista vesinäytteistä.⁵

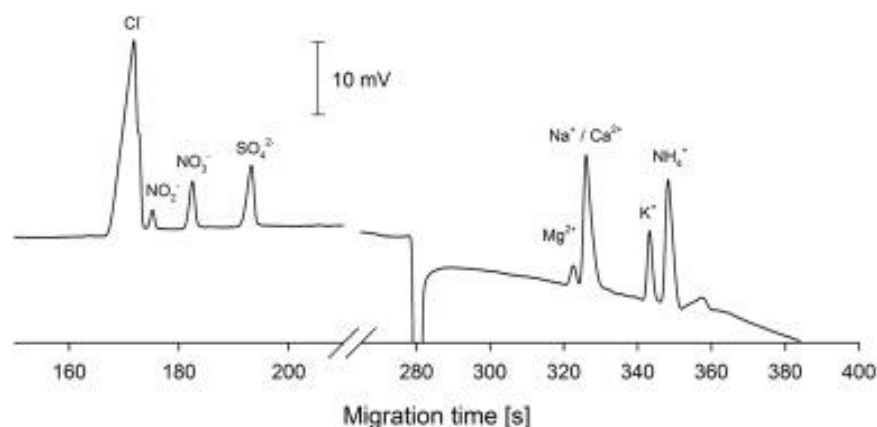
4.2. Epäorgaanisten typpispesiesten erottaminen jätevedestä

Fuiko tutkimusryhmineen⁶ perehtyi epäorgaanisten typpiyhdisteiden (NO_2^- , NO_3^- ja NH_4^+) jatkuvaan määrittämiseen jätevesinäytteistä siirrettävällä CE-laitteistolla, joka kykeni samanaikaiseen anionien ja kationien määrittämiseen yhdistämällä hydrodynaamiseen pumppaukseen elektrokineettisen liikkeen. CE-laitteisto oli kytketty membraani-suodatuslaitteistoon mahdollistaen suoran näytteenoton jätevesiprosessista ja nesteenkäsittelyä varten käytettiin automatisoitua näytteensyöttösarjaa. Perinteinen UV-detektointi, ja toisaalta myöskään ioniselektiiviset elektrodit eivät tulleet kyseeseen, sillä ne eivät sovellu kaikkien tarkasteltavien spesiesten havaitsemiseen, tai laitteistosta muodostuisi liian monimutkainen. Johtokyvyn mittaukseen perustuva C^4D -detektori sen sijaan mahdollistaa kaikkien ionien määrittämisen ja se voidaan toteuttaa osana kannettavaa instrumentointia. Jatkuva ja vakaa toiminta osoitettiin 24 tunnin aikana pilottikokoisen jätevedenpuhdistamon ilmastussäiliössä. Tämä on merkittävä askel kohti automatisoitavaa vedenlaadun seurantaan, sillä vastaavanlaisia laitteistoja ei ollut artikkelin julkaisuhetkellä (2019) kaupallisesti saatavilla. Erottamisessa käytetty laitteisto on esitetty kuvassa 5; tarkemmat yksityiskohdat systeemin toiminnasta löytyvät alkuperäisestä artikkelista⁶, mutta todettakoon kyseessä olevan erittäin hyvin automatisoitu kokoonpano, jossa kapillaari huuhdellaan, esikäsitellään ja näyte syötetään 12 minuutin sykleissä.⁶



Kuva 5. Jäteveden erottamisessa käytetty laitteisto.⁶ Julkaistu Elsevierin luvalla.

Elektrolyyttiliuos koostui L-histidiinistä, 2-(N-morfoliini)etaanisulfoni-haposta (MES), setrimoniumbromidista (CTAB) sekä 18-kruunu-6-eetteristä, jonka tarkoituksena oli kompleksoida kaliumionit ja alentaa niiden liikkuvuutta mahdollistaen kalium- ja ammoniumionien erottamisen toisistaan. Liuoksen pH-arvo pidettiin lähes samana kuin jätevedellä näytteiden hajoamisen välttämiseksi, ja typpi-ionien varautumisen varmistamiseksi täyden mahdollisen vasteen saamiseksi. Jätevesinäytteet syötettiin kapillaariin membraarisuodattimen läpi ilman muuta käsittelyä. Ensimmäisenä erottuivat anionit (ensin korkean liikkuvuuden omaavat ionit) ja jälkimmäisenä kationit (ensin alhaisen liikkuvuuden omaavat ionit). Anionien erottuminen suoritettiin kääntämällä EOF:n suunta lisäämällä elektrolyyttiliuokseen CTAB:a ja kytkemällä +24 kV jännite siihen kapillaarin päähän, jossa detektori sijaitsi. Samanaikaisesti kationit kulkeutuivat kohti injektio-päätä, mutta jotta niiden poistuminen kapillaarista estettäisiin ja kulkusuunta käännettäisiin, käytettiin hydrodynaamista virtausta kohti detektoria: kun erotetut anionit ohittivat detektorin, korkea jännite kytkettiin pois ja 13 psi paine nostettiin arvoon 60 psi, jolloin muodostunut korkea virtausnopeus esti jo valmiiksi erottuneiden kationien sekoittumisen.⁶ Eräs jätevesinäytteen erottumisesta saatu elektroferogrammi on esitetty kuvassa 6.



Kuva 6. Jätevesinäytteen erottumisesta saatu elektroferogrammi.⁶ Julkaistu Elsevierin luvalla.

Piikkien muutosta tarkasteltiin vaihtelevilla näytteensyöttöpaineilla ja parhaat tulokset (suhteellinen keskihajonta, RSD < 2%) saatiin 8 ja 12 psi paineen välillä. Alhaisempien paineiden suuremmat poikkeamat aiheutuivat todennäköisesti pienen hydrostaattisen takaisinvirtauksen aiheuttamasta haitallisesta turbulenssivaikutuksesta näytevyöhykkeen alussa, kun ylimäärä näytettä poistettiin. Tilanteen korjaamiseksi tällä painealueella on

tarpeen säätää virtausnopeutta ja jälkiliuoksen tilavuutta erotuskapillaarin T-kappaleessa. Lineaariset kalibraatiokuvaajat mahdollistivat dynaamisen systeemin kalibroinnin injektiopaineiden vaihtelulla; kun piikit asettuvat päällekkäin, on mahdollista laskea injektiopainetta ja piikkien hävitessä puolestaan nostaa. Jäteveden yleensä alhaisen nitraattipitoisuuden vuoksi analyysilaitteelta edellytetään alhaisia toteamisrajoja niin, että mahdolliset ongelmat puhdistusprosessissa ovat havaittavissa kun jonkin typpispesieksen pitoisuus alkaa nousta. Vaatimuksena on kuitenkin suurien ammoniumtyppipitoisuuksien määrittäminen suhteellisen alhaisilla injektiopaineilla, jotta ammoniumionit voidaan erottaa kaliumioneista. Tämä vaikeuttaa nitraatin ja nitriitin määrittämistä niiden hyvin alhaisten pitoisuuksien vuoksi. On siis huomioitava, että muutoksilla näytteensyötössä on aina vaikutus kaikkiin ioneihin. Mahdollisia pitoisuusrajoja tutkittaessa havaittiin kloridin ja nitriitin piikkien asettuvan päällekkäin kloridin pitoisuuden ollessa yli 120 mg/l.⁶

Systeemin vakauden ja toimintakyvyn osoittamiseksi jokaisen viiden peräkkäisen jätevesianalyysin jälkeen ajettiin yksi standardinäyte, joille 24 tunnin aikaiset piikkien pinta-alojen suhteelliset keskihajonnat olivat hieman suurempia (NO_2^- 2,1%, NO_3^- 0,7% ja NH_4^+ 1,2%) kuin vastaavat kalibroinnista saadut (1,34%, 0,52% ja 0,97%). Laboratoriossa suoritettuihin referenssimäärytyksiin verrattuna jäteveden sisältämille typpispesieksille saatiin seuraavanlaiset palautumisasteet: NO_2^- 90 – 104%, NO_3^- 92 – 108% ja NH_4^+ 94 – 103%, joskin tulosten virheellisyyteen vaikuttaa osittain laboratorion lämpötilavaihtelut. Tutkimus osoitti, että yhdistämällä elektrokineettinen liike ja hydrodynaaminen pumppaus, voidaan epäorgaanisten typpiyhdisteiden erottaminen suorittaa jätevesinäytteistä hyvällä tehokkuudella tulosten suhteellisten poikkeamien ja tarkkuuksien perusteella. Määritetyt toteamisrajat (NO_2^- 0,03 mg/l, NO_3^- 0,08 mg/l ja NH_4^+ 0,11 mg/l) osoittavat tekniikan soveltumisen yhdyskuntajätevedenpuhdistamoiden käytettäväksi ja 12 minuutin syklien olevan riittävä pitkäaikaiseen biologisten prosessien valvontaan pysyvällä vakaudella. CE-tekniikan uudelleentoistettavuushaasteet voidaan ratkaista käyttämällä korkealaatuisia teollisuuslaitteistoja. Lisäksi käytännön sovellutuksen kannalta lämpötilan tarkka kontrollointi on toivottavaa mittausvirheiden vähentämiseksi.⁶

5. YHTEENVETO

Tutkijat ja ympäristöanalytiikkaa suorittavat tahot ovat kiinnostuneita uudenlaisista, yksinkertaisesti toteutettavista ja edullisista, sekä ennen kaikkea tehokkaista analyysimenetelmistä. Kapillaarielektroforeesi on osoittautunut hyvin mielenkiintoiseksi vaihtoehdoksi perinteisten ionikromatografisten erotusmenetelmien rinnalle. CE-tekniikan selkeinä etuina ovat korkea erotustehokkuus, edulliset kustannukset, nopeat analyysiajat sekä laitteistokokoonpanon automatisoitavuus. Luonnollisesti tämäkin erotusmenetelmä sisältää ongelmakohtia, sillä tulosten uudelleentoistettavuus voi olla haasteellista, ja lisäksi erottumiseen vaikuttavia muuttujia on olemassa hyvin paljon. Riittävän laajalla taustatutkimuksella, vaihtelevien erotusolosuhteiden testaamisella ja muuttuvien parametrien optimoimisella voidaan saavuttaa erittäin luotettavia tuloksia. Erityisesti automatisoitujen näytteenäytöyksiköiden avulla menetelmän uudelleentoistettavuus voidaan saada vakuuttavalle tasolle.

CE-tekniikan hyödyntäminen käytännön analyysimenetelmänä vaatii riittävästi tutkimusta niin, että voidaan ymmärtää miten näytematriisiin sisältämät epäorgaaniset yhdisteet käyttäytyvät kapillaariseinämän ja valmistetun elektrolyyttiliuoksen kanssa, jotta ionispesieket saadaan erotettua toisistaan riittävällä resoluutiolla ja vaadittavilla toteamisrajoilla. Näytteenäytöön sekä detektointimenetelmän valintaan on kiinnitettävä erityistä huomiota, unohtamatta erilaisten elektroforeettisten tekniikoiden olemassaoloa sekä näytteiden esikäsittelyn ja mahdollisen esikonsentroinnin tarpeellisuutta.

Tässä kirjallisuuskatsauksessa esiteltiin mielenkiintoisia esimerkkejä erilaisten näytematriisien sisältämien epäorgaanisten yhdisteiden erottamisesta CE-tekniikalla, sekä tutustuttiin yksityiskohtaisemmin kahteen käytännön sovellutukseen. Näiden, ja lukuisten muiden tieteellisten julkaisuiden ja tutkimusten nojalla voidaan korostaa menetelmän potentiaalia ja soveltuvuutta monenlaisiin käyttökohteisiin. Tulevaisuudessa lienee odotettavissa yhä parannuksia detektointimenetelmien ja näytteenkäsittelyn suhteen. Lisäksi kaupallisesti saatavien, pitkälle automatisoitavien ja mahdollisuuksien mukaan myös kannettavien erotuslaitteistojen tarjonta tulee varmasti kasvamaan.

6. KIRJALLISUUSVIITTEET

1. Weinberger, R., *Practical capillary electrophoresis*. 2nd ed., Academic Press, San Diego, **2000**.
2. Marina, M.L., Ríos, A., Valcárcel, M., *Analysis and detection by capillary electrophoresis*. Vol. 45, Elsevier Science and Technology, Oxford, **2005**, 1-121.
3. Timerbaev, A.R., Dabek-Zlotorzynska, E., van den Hoop, M.A.G.T., *Analyst*. **1999**, *124*, 811-826.
4. Heiger, D., *High performance capillary electrophoresis: An introduction*. Agilent Technologies, Saksa, **2000**, 12-93.
5. Šimuničová, E., Kaniansky, D., Lokšíková, K., *J. Chromatogr. A*. **1994**, *665*, 203-209.
6. Fuiko, R., Saracevic, E., Koenka, I.J., Hauser, P.C., Krampe, J., *Talanta*. **2019**, *195*, 366-371.
7. Pozdniakova, S., Padaruskas, A., Schwedt, G., *Anal. Chim. Acta*. **1997**, *351*, 41-48.
8. Westergaard, B., Hansen, H.C.B., *Analyst*. **1998**, *123*, 721-724.
9. Dabek-Zlotorzynska, E., Dlouhy, J.F., *J. Chromatogr. A*. **1995**, *706*, 527-534.
10. Jimidar, M., Hartmann, C., Cousement, N., Massart, D.L., *J. Chromatogr. A*. **1995**, *706*, 479-492.
11. Sajtos, Z., Andrasi, M., Gaspar, A., *J. Chromatogr. B*. **2020**, *1142*, 122052.
12. Haddad, P.R., *J. Chromatogr. A*. **1997**, *770*, 281-290.
13. Harvey, D., *Analytical chemistry 2.1*, electronic version, **2020**, 755-762, viitattu 18.2.2021 [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Book%3A_Analytical_Chemistry_2.1_\(Harvey\)](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Book%3A_Analytical_Chemistry_2.1_(Harvey)).
14. Marina, M.L., *Talanta*. **1994**, *41*, 1411-1433.
15. Huang, X., Gordon, M.J., Zare, R.N., *Anal Chem*. **1988**, *60*, 375-377.
16. Johns, C., Breadmore, M.C., Macka, M., Ryvolová, M., Haddad, P.R., *Electrophoresis*. **2009**, *30*, S53-S67.
17. Gaš, B., *Peakmaster*. <https://web.natur.cuni.cz/gas/peakmaster.html> (haettu 18.2.2021).

18. De La Guardia, M., Armenta, S., *Green analytical chemistry*. Vol. 57, 1st ed., Elsevier Science and Technology, Oxford, **2010**, 147-150.
19. Aranas, A.T., Guidote, A.M., Quirino, J.P., *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, 394, 175-185.
20. Wätzig, H., Günter, S., *CCLM*. **2003**, 41, 724-738.
21. Pacáková, V., Štulík, K., J. *Chromatogr. A*. **1997**, 789, 169-180.